

SAFC®

Pharma & Biopharma Raw
Material Solutions



产品信息

EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基

化学成分限定细胞培养基

产品说明

EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基是一种化学成分限定的细胞培养基，特别设计用于中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的强化灌流过程。该培养基的开发目的是在低的细胞特定灌流速度 (CSPR) 下达到和保持高细胞密度，且支持悬浮培养物中的单克隆抗体和重组蛋白质的高体积生产率。生产各种蛋白质的若干有关的工业 CHO 细胞谱系 (CHOZN® GS, CHO-S, CHO-DG44, CHO-K1)，已验证了该培养基在灌流过程中的性能。配方不含动物组分，配制时不含 L- 谷氨酰胺。

产品使用

EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基可用作灌流应用中的扩大培养基和生产培养基。此产品仅用于生物制造工业的研发或生产，不能用于人体或治疗使用。

EX-CELL® Advanced HD灌流培养基的配制方法

该培养基的加水过程应当遵循以下说明：

- 在室温下，量取 80% 最终所需体积的 Mili-Q® 水或者相当等级的细胞培养用水。
- 一边搅拌，一边缓慢加入 28.57 g/L 的粉末培养基。继续搅拌 30 分钟。产物将保持轻微混浊。

- 测定 pH, 若 $\text{pH} < 4.5$, 则用 5N NaOH 调整到 4.5 ± 0.1 。
- 向溶液中添加 1.565 g/L 的碳酸氢钠。连续搅拌 30 分钟。
- 用 5N NaOH 将 pH 调整到 9.0 ~ 9.1, 搅拌 10 分钟, 或直至产物澄清。
- 使用 5N HCl, 将 pH 调整到 7.3 ± 0.1 。
- 加入 Milli-Q® 水或者相当等级的细胞培养用水, 定容到 100% 最终体积。
- 测定渗透压。最终渗透压应当为 320 - 360 mOsmol/kg。
- 无菌过滤器采用低蛋白结合的膜式过滤器, 孔径为 0.22 微米。
- 对于大容量情况, 推荐采用低蛋白结合的 0.45 微米预过滤器。
- 使用前, 避光保存在 2-8° C 环境中。配制好的 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基可在至少 30 天内保持稳定。

注意: 该培养基不含 L-谷氨酰胺。如有需要, 在使用前以无菌方式补充。

储存

- 干粉应当避光储存在 2-8°C 的干燥环境中。
- 过期勿用。

有效期

- 12 个月

以灌流模式, 使用 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基

- 使用 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基培养非 GS CHO 细胞系之前, 添加 L- 谷氨酰胺。推荐浓度取决于细胞系。建议采用起始浓度 4-6 mM。
- 使用本产品时, 不需补充表面活性剂(例如泊洛沙姆)。
- 在接种系列扩增期间, 如有需要, 应当添加细胞选择剂。
- 该培养基含有 $< 2\mu\text{M}$ 胸腺嘧啶核苷。在用于非 dhfr 系统之前, 可添加 1x HT 补充物(非必需)。

直接驯化

细胞系可直接在 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基中驯化。细胞接种密度应当为 $3 - 5 \times 10^5$ 细胞 /mL, 然后当密度达到 $1 - 2 \times 10^6$ 细胞 /mL, 且活率 $\geq 80\%$ 时, 对细胞执行次代培养。当细胞获得稳定的倍增时间, 且活率 $\geq 90\%$, 至少 2-3 次传代, 则驯化完成。

在 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基中驯化的细胞, 均可在 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基中直接解冻和培养。

逐步驯化

下面提供的驯化指南, 依靠定期细胞次代培养, 以保持培养物处于对数生长期。这通常意味着细胞每 3-4 天应当进行一次传代。建议每个驯化步骤至少进行两次传代, 以确保细胞恰当地适应至新的培养基环境中。

现行培养基与 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基的比例 (%)	接种密度 ($\times 10^5$ 细胞/mL)	细胞生长评价	进行下一步的验收准则
75:25	3.0	细胞密度、活率处于细胞对数生长中期	正常的细胞倍增时间; 活率 >80%, 至少 2 次传代
50:50	3.0	细胞密度、活率处于细胞对数生长中期	正常的细胞倍增时间; 活率 >80%, 至少 2 次传代
25:75	3.0	细胞密度、活率处于细胞对数生长中期	正常的细胞倍增时间; 活率 >80%, 至少 2 次传代
10:90	3.0	细胞密度、活率处于细胞对数生长中期	正常的细胞倍增时间; 活率 >80%, 至少 2 次传代
0:100	3.0	细胞密度、活率处于细胞对数生长中期	当细胞保持正常的倍增时间, 活率 $\geq 90\%$, 至少 2 次传代, 则驯化完成

次代培养

1. 将已加水的 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基预热到室温。
2. 以无菌方式从烧瓶中取出少量细胞培养物样品, 使用血细胞计数器或自动细胞计数器, 以台盼蓝拒染法计数。活率应当始终高于 90%。
3. 确定接种一个新烧瓶 (目标工作体积, 起始细胞密度 $2 - 3 \times 10^5$ 活细胞 / mL) 所需的细胞培养物的正确体积。
4. 以无菌方式, 向新烧瓶中加入相应数量的新鲜培养基 (已预热到室温), 然后加入计算数量的细胞。
5. 使用以 120-140 rpm 旋转的轨道摇动器平台 (19 mm 直径轨道), 在 37°C 、含 5% CO_2 的潮湿空气气氛中进行培养。
6. 让细胞传代: 重复上述步骤 (至少一周两次), 始终保持细胞处于指数生长期。

注意: 细胞传代时, 培养基携带不应当超过最终体积的 25%。若携带超过 25%, 建议执行离心。

深低温保藏

可获得在 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基中驯化的细胞。

1. 准备所期望数量的细胞, 在对数生长中期收获, 活率超过 90%。
2. 配制冷冻培养基 (由 46.5% 低温 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基、46.5% 条件培养基和 7% 二甲亚砜 (DMSO) 组成)。
3. 收获细胞 ($200 \times g$, 离心 5 分钟), 小心地除去上清液。
4. 让细胞颗粒再悬浮于冷冻培养基中 (细胞密度为 $10 - 20 \times 10^6$ 活细胞 / mL)。
5. 将 1-2 mL 该悬液快速转移到无菌的冷冻小瓶中。
6. 将小瓶放进低温箱或遵循标准程序 (每分钟降低 1°C) 的受控速度冷冻装置。
7. 将小瓶转移到液氮中 (推荐蒸气相), 以长期储存。

解冻

1. 在洁净台或层流罩下,在 50 mL 离心管中配制 10 mL 培养基。
2. 在 37°C 水浴中,快速解冻 (<1 分钟) 一个冷冻细胞小瓶。当冰颗粒与小瓶壁分离,取出小瓶(温度更高时,高浓度的 DMSO 可有毒性效应)。
3. 将小瓶的内容物转移到来自步骤 1 的锥形管中,以 200xg 离心 5 分钟。弃去上清液,然后可让细胞再悬浮于 10 mL 培养基中,并转移到盛有 20 mL 培养基的摇瓶中。
– 或者,可将小瓶的全部内容物无菌转移到盛有 28-29 mL 已预热的完整 EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基的 125 mL 摇瓶中。
4. 使用以 120-140 rpm 旋转的轨道摇动器平台(19 mm 直径轨道),在 37°C、含 5%CO₂ 的潮湿空气气氛中进行培养。

EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基订货信息

货号	产品名称	包装规格	配制量
24370C-5L	EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基	0.142 kg	5 升
24370C-200L	EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基	5.714 kg	200 升
24370C-500L	EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基	14.285 kg	500 升
24370C-800L	EX-CELL® Advanced HD 灌流培养基	22.856 kg	800 升

细胞培养添加物订货信息

货号	产品名称	包装规格
1.37020.5000	氢氧化钠小粒,适合于生物制药生产,EMPROVE® bio	5 kg
1.37013.2500	碳酸氢钠,适合于生物制药生产,EMPROVE® bio,欧洲药典,英国药典,美国药典,日本药典	2.5 kg
1.00286.1000	L- 谷氨酰胺,适合用作赋形剂,EMPROVE® exp,德国药典,美国药典	1 kg

除菌过滤器订货信息

货号	产品名称	包装规格
GPWP02500	默克密理博 Express® PLUS 膜,0.22 µm, 25 mm	100
GVWP02500	Durapore® 膜,0.22 µm, 25 mm	100